

МОДУЛЯЦІЯ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТІ ЦИСПЛАТИНУ КЛАСТЕРНИМИ СПОЛУКАМИ РЕНІЮ(III) У МОДЕЛІ КАНЦЕРОГЕНЕЗУ

Введення сполуки ренію з ізобутиратними лігандами, розташованими в цис-положенні навколо почверного зв'язку, призводило до гальмування процесів цитолізу клітин печінки та зниження активації ферментативних процесів тканин печінки в моделі канцерогенезу та за умов введення цисплатину. Сполука $Re_{cisobyt}$ проявила більш ефективні властивості до модуляції гепатотоксичної дії цисплатину, ніж аналогічна сполука ренію з адамантільними лігандами. Вперше вивчено вміст відновленого глутатіону в клітинах печінки та плазмі крові щурів-пухлиноносіїв при введенні системи реній-платина і запропоновано приблизну схему, що пояснює можливу роль глутатіонової системи у прояві гепатопротекторних властивостей сполук з почверним зв'язком.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: модуляція, гепатотоксичність, цисплатин, кластерні сполуки ренію(III).

ВСТУП. У наших попередніх роботах [2] показано гепатопротекторні властивості кластерних сполук ренію(III) з органічними лігандами (КРОЛ) у моделях канцерогенезу та токсичного гепатиту. Було випробувано КРОЛ тетракарбоксилатного, тетрафосфатного та цис-дикарбоксилатного типів. У ряді сполук КРОЛ структурного типу цис-дикарбоксилатів визначено сполуку з адамантільними лігандами, що проявляла надзвичайно значні гепатопротекторні властивості, що пояснювалось саме властивостями каркасних лігандів стереїдного типу. Проте існує й інша точка зору щодо пояснення цього явища – унікальні властивості почверного зв'язку як пастки радикалів, які виявляють *in vivo* незалежно або разом із властивостями органічного радикала. Отже, пошук гепатопротекторів у ряді цис-дикарбоксилатів є перспективним напрямком досліджень. Відомо, що система глутатіонового захисту є однією з найважливіших стратегій знешкодження небезпечних радикальних вибухів [6, 13, 23], що супроводжують цисплатинову терапію і канцерогенну дію в печінці [10, 12, 15–18, 24, 26]. Глутатіонову антиоксидантну ланку в печінці не досліджували у моделі канцерогенезу та при застосуванні протипухлинної системи реній-платина (система Re–Pt).

Отже, метою роботи було вивчити можливий гепатопротекторний вплив кластерної сполуки ренію цис-дикарбоксилатного ряду з

ізобутирільними лігандами при використанні системи Re–Pt у моделі канцерогенезу щурів та з'ясувати питання про участь даної системи в механізмі гепатопротекції.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Вивчали сполуку цис-діізобутиратодиреній(III)тетрахлорид – $(Re_{cisobyt})$ – цис $Re_2(iC_3H_7COO)_2Cl_4$, синтезовану на кафедрі неорганічної хімії Українського державного хіміко-технологічного університету (м. Дніпропетровськ, Україна) [5].

Експеримент з вивчення протипухлинної активності КРОЛ проводили на щурах лінії Вістар масою 100–150 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Маніпуляції зі щурами виконували відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, 1986). Карцинома Герена Т8 – типова епітеліальна солідна пухлина з ефективністю перевивання у 75 % та без випадків спонтанного розсмоктування. Чутливість цієї пухлини до відомих протипухлинних засобів дозволяє використовувати її при доборі та випробуванні нових хімотерапевтичних агентів. Донорами ракових клітин були щури-пухлиноносії, яких придбали в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України безпосередньо до трансплантації. Донора з двотижневою пухлиною (діаметром 40–45 мм) забивали, вилучали пухлину. Транс-

плантацію карциноми Герена Т8 здійснювали методом підшкірного введення в ділянку стегна задньої кінцівки 0,5 мл 20 % суспензії клітин пухлини у фізіологічному розчині. Цисплатин (сPt) вводили одноразово у дозі 8 мг/кг на 9 добу після трансплантації пухлини. Сполуки ренію вводили за схемою антиоксидантної терапії 10 разів, починаючи з 3 доби після перевивання пухлини з інтервалом в 1 добу, в кількості 7 мкмоль/кг маси тварини, як описано в [4].

Тварин було поділено на п'ять груп (по 15 щурів у кожній): 1-ша – інтактні тварини (контроль); 2-га – тварини з карциномою Герена Т8; 3-тя – тварини з карциномою Герена Т8, яким вводили цисплатин у вигляді розчину за схемою [22]; 4-та – тварини з карциномою Герена Т8, яким вводили систему Re–Pt як одноразове введення цисплатину в дозі 8 мг/кг на 9 добу та сполук ренію в наноліпосомній формі, починаючи з 3 доби після трансплантації ракових клітин з інтервалом в 1 добу протягом 21 доби, у дозі 7 мкг/кг з кінцевим молярним співвідношенням введених сполук ренію і платини 4:1 (Re+cPt) за схемою антиоксидантної терапії (спосіб 2) [21] ($[Re_{cisisobyt}]nl+cPt$); 5-та – тварини з карциномою Герена Т8, яким вводили систему Re–Pt, щурам-пухлиноносіям вводили також у вигляді змішаних наноліпосом (nl) розміром 10–100 нм, навантажених цисплатином та сполукою ренію у співвідношенні компонентів 4:1 (спосіб 3) ($[Re_{cisisobyt}+cPt]nl$ 4:1). Систему Re–Pt вводили внутрішньочеревно на 3 день після трансплантації пухлини з розрахунку 7 мкмоль/кг ренієвої сполуки десятикратно. На 21 день після трансплантації пухлини щурів декапітували під етерним наркозом.

Функцію печінки визначали за змінами активності аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ), лужної фосфатази (ЛФ) і гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) з викорис-

танням стандартних лабораторних методик тест-наборів (“Реагент”, Україна, м. Дніпропетровськ) за методами [7, 19].

Рівень малонового діальдегіду (МДА) в плазмі та гомогенаті печінки визначали за методикою [1], глутатіону (GSH) – за [11].

Статистичний аналіз отриманих даних проводили в Microsoft Excel із визначенням імовірних відмінностей з використанням t-критерію Стьюдента [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як розвиток новоутворення, так і введення сPt викликали явище гіперферментемії, тобто збільшення активності ферментів, як у плазмі крові, так і в тканині печінки (табл. 1).

Відомо, що під дією токсичних факторів, якими є канцерогенез та сPt, відбувається спочатку активація процесів трансамінування, фосфорилування, окиснення-відновлення тощо в клітинах печінки, а потім їх цитоліз із наступним вивільненням ферментів у кров [2, 12, 17, 26]. Найбільш чутливими до токсичних речовин є процеси трансамінування, про що свідчить суттєве зростання АлАТ і АсАТ у плазмі крові щурів-пухлиноносіїв. Слід відмітити, що введення сполуки $Re_{cisisobyt}$ у ліпосомній формі на фоні введення сPt знижувало як активацію біохімічних процесів у тканині печінки, так і цитолітичні процеси. Останнє можна пояснити мембраностабілізуювальною та антиоксидантною властивостями КРОЛ завдяки наявності в їх структурі почверного зв'язку [21]. Така властивість $Re_{cisisobyt}$ за своїми параметрами перевищує властивість свого попередньо вивченого аналога з адамантильними радикалами, особливо це стосується процесів вивільнення ЛДГ і ГГТ, рівень яких у плазмі крові зменшується набагато нижче контролю. Слід також відмітити, що введення $Re_{cisisobyt}$ більш вибірково впливає на активацію біохімічних процесів у тканині печінки (дані ферментативної активності у гомогенаті тканини). Особливо це

Таблиця 1 – Активність ферментів у плазмі крові й печінці щурів, % до контролю

Група	АлАТ, %		АсАТ, %		ГГТ, %		ЛДГ, %		ЛФ, %	
	плазма	гомогенат	плазма	гомогенат	плазма	гомогенат	плазма	гомогенат	плазма	гомогенат
Т8 (2-га група)	156*	246*	233*	312*	66*	150*	166*	127*	166*	72*
Т8+сPt (3-тя група)	242*	346*	248*	404*	118*	167*	505*	350*	188*	843*
Т8+[$Re_{cisisobyt}$]nl+cPt] (4-та група)	69#	153#	122#	235#	15#	60#	118#	82#	18#	331#
Т8+[$Re_{cisisobyt}$ +cPt]nl4:1 (5-та група)	80#	97#	93#	206#	4#	33#	83#	98#	14#	306#

Примітки. Тут і в наступних таблицях:

1) * – достовірна різниця порівняно з контролем ($p<0,05$);

2) # – достовірна різниця порівняно з групою Т8+сPt ($p<0,05$).

стосується активності ГГТ, рівень якої знижується більше ніж у 4 рази. Оскільки ГГТ є ферментом глутатіонового циклу [9, 25], слід припустити, що дана сполука проявляє унікальні антиоксидантні властивості та впливає на процеси, пов'язані з біосинтезом глутатіону.

Введення наноліпосом змішаного складу, де цисплатин перебував у ліпосомній формі, теж призводило до гальмування процесів цитолізу клітин печінки та вибірково процесів активації ферментів тканин печінки. Такий спосіб введення протипухлинної системи реній–платина з $Re_{cisobyt}$ також сприяв активному гальмуванню активності ГГТ, що було підставою розглянути здатність цієї сполуки до гальмування процесу пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) (табл. 2).

Розвиток новоутворення викликав значне підвищення (майже в 7 разів) інтенсивності процесу ПОЛ. Введення цисплатину, незважаючи на гальмування росту пухлини, також сприяло інтенсивності процесу порушення мембран печінки, що вважають однією з причин гепатотоксичності cPt [2, 8, 14, 20].

Введення щурам-пухлиноносцям сполуки Re_{cisob} різними способами гальмувало процес ПОЛ – у 13–16 разів у плазмі крові й у 2–2,5 раза у тканині печінки порівняно з тваринами 3-ї групи, яким вводили cPt. Це набагато перевищувало властивості сполуки з адамантильними радикалами, для якої ці параметри склали 4 та 1,2–1,3 відповідно [2]. Отже, заміна адамантильного ліганду на ізобутиратний у молекулі КРОЛ призводить до більш суттєвого гепатопротекторного ефекту щодо гасіння радикального процесу ПОЛ.

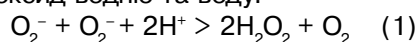
У таблиці 3 наведено рівні глутатіону в досліджених тканинах.

Як і слід було очікувати, введення $Re_{cisobyt}$ обома способами підвищувало рівень глутатіону як у плазмі крові, так і в тканині печінки

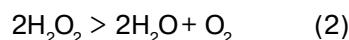
порівняно з цисплатиновою групою. Проте таке підвищення не досягало рівня контрольної групи.

Оскільки рівень глутатіону в тканині печінки досліджують уперше при застосуванні системи $Re-Pt$, не можна говорити про закономірності впливу почверного зв'язку на механізм дії глутатіонової системи печінки щурів. Проте ці дані дають нам можливість припустити такий каскад біохімічних реакцій у клітинах печінки з участю $Re_{cisobyt}$

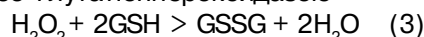
Супероксид-аніон O_2^- (активна форма кисню) бере участь в оксидативному стресі й активно перетворюється супероксиддисмутазою у пероксид водню та воду:



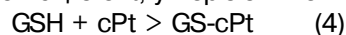
Пероксид водню розщеплюється каталазою:



або глутатіонпероксидазою



Тобто в клітинах печінки існує 2 шляхи для знешкодження пероксиду водню. Імовірно, сполука $Re_{cisobyt}$ взаємодіє з радикалами за типом супероксиддисмутазної, каталазної реакцій (1), (2) або й раніше із супероксид-аніоном O_2^- . Внаслідок цього реакція (3) гальмується субстратно – відсутністю пероксиду водню і глутатіон може здійснювати більш ефективну детоксикацію cPt, утворюючи кон'югат:



Отже, гальмування пероксидного стресу сполукою ренію призводить до більш інтенсивної детоксикаційної функції печінки пухлиноносців шляхом вивільнення глутатіону з глутатіонпероксидазної реакції.

Водночас гамма-глутаміловий цикл теж отримує додатковий субстрат (рис.).

ГГТ – єдиний відомий фермент, що розщеплює глутатіон і глутатіонові кон'югати. Активний центр ферменту міститься на зовнішній

Таблиця 2 – Рівень ТБК-активних продуктів плазми і гомогенату печінки щурів

Група	МДА в плазмі, ммоль/мл	МДА в печінці, ммоль/г
Контроль (1-ша група)	0,419±2,08	1,375±2,67
T8 (2-га група)	2,708±5,51*	2,500±5,05*
T8+cPt (3-тя група)	2,291±1,89*	1,750±2,12*
T8+[$Re_{cisobyt}$]n+cPt (4-та група)	0,143±0,005 [#]	0,932±1,97 [#]
T8+[$Re_{cisobyt}$]n+cPt4:1 (5-та група)	0,178±0,08 [#]	0,754±1,24 [#]

Таблиця 3 – Кількість відновленого глутатіону в плазмі й гомогенаті печінки щурів

Група	GSH у плазмі, мкмоль/л	GSH у печінці, мкмоль/кг
Контроль (1-ша група)	0,560±0,13	0,780±0,23
T8 (2-га група)	0,081±0,036*	0,068±0,004*
T8+cisPt (3-тя група)	0,212±0,095*	0,156±0,007*
T8+[$Re_{cisobyt}$]n+cisPt (4-та група)	0,231±0,028 [#]	0,135±0,048 [#]
T8+[$Re_{cisobyt}$]n+cisPt 4:1 (5-та група)	0,229±0,072 [#]	0,209±0,066 [#]

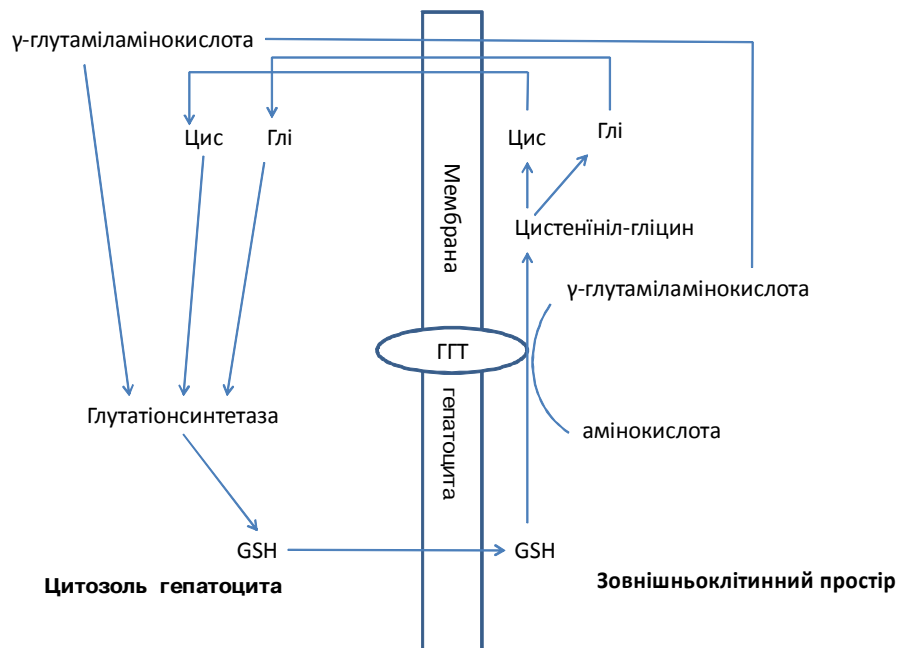


Рис. Гамма-глутаміловий цикл за [13] (скорочено).

мембрані клітини й активується завдяки збільшенню концентрації глутатіону, що відбувається внаслідок гальмування реакції (3). Водночас збільшується концентрація глутатіону в зовнішньоклітинному просторі, що ми спостерігаємо в експерименті при дослідженні рівня глутатіону в плазмі крові. Запропонована нами схема пояснює зниження активності ГГТ та концентрації глутатіону впливом Re, проте є гіпотетичною та вимагає додаткових досліджень.

ВИСНОВКИ. Введення сполуки ренію з ізобутиратними лігандами, розташованими в цис-положенні навколо почверного зв'язку, призводило до гальмування процесів цитолізу клітин печінки та зниження активації фермен-

тативних процесів тканин печінки у моделі канцерогенезу та за умов введення цисплатину. Саме сполука $Re_{cisobyt}$ проявила більш ефективні властивості до модуляції гепатотоксичної дії цисплатину, ніж аналогічна сполука ренію з адамантильними лігандами. Вперше вивчено вміст відновленого глутатіону в клітинах печінки та плазмі крові щурів-пухлиноносіїв при введенні системи реній-платина та запропоновано приблизну схему, що пояснює можливу роль глутатіонової системи у гепатопротекторній функції сполук з почверним зв'язком. Сполуки ренію з почверним зв'язком є перспективними речовинами для медичної практики, які можна використовувати для гальмування радикальних вибухів у клітинах при різних патологічних станах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева // Лаб. дело. – 1988. – 2. – С. 41–43.
2. Івчук В. В. Вплив протипухлинної системи реній-платина на біохімічний стан печінки / В. В. Івчук // Укр. біохім. журн. – 2011. – 83, № 3. – С. 83–91.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия : учеб. пособ. для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Леус І. В. Активність супероксиддисмутази та інтенсивність оксидативного стресу при застосуванні

кластерних сполук ренію з алкільними лігандами як протипухлинних засобів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / І. В. Леус. – К., 2012. – 21 с.

5. Синтез и свойства цис-тетрагалогено-дикарбоксилатных производных дирения(III) с адамантанкарбоновыми кислотами / А. В. Штеменко, А. А. Голыченко, И. Г. Семёнова, Я. С. Вербицкая // Вопр. химии и хим. технологии. – 2001. – № 4. – С. 31–34.
6. Blakley B. W. Strategies for prevention of toxicity caused by platinum-based chemotherapy / B. W. Blakley // Laryngoscope. – 2001. – 112. – P. 1997–2001.

7. Dawson J. M. Method of protein quantification Evidence for Photosensitivity / J. M. Dawson, P. L. Heatlic Lowry // Anal. Biochem. – 1984. – **140**, № 2. – P. 391–393.
8. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats / Y. Abdurrauf, Ahmet, O. C. Atessahin [et al.]. // Dfsic. Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2007. – **101**. – P. 345–349.
9. Glutamyl Transpeptidase. What Does the Organization and Expression of a Multipromoter Gene Tell Us about its Functions? / W. Lieberman Michael, Roberto Barrios, Z. Bing [et al.] // American Journal of Pathology. – 1995. – **147**, № 5. – P. 1175–1185.
10. Iraz M. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester administration on Cisplatin 10 mg kg⁻¹ platin-induced oxidative damage to liver in rat / M. Iraz // Cell. Biochem. Funct. – 2006. – **24**. – P. 357–361.
11. Jaeschke H. Use of isolated perfused organs in hypoxia and ischemia/ reperfusion oxidant stress / H. Jaeschke, J. R. Mitchell // Methods Enzymol. – 1990. – **186**. – P. 752–759.
12. Koc A. Protective agent, erdosteine, against Cisplatin 10 mg kg⁻¹ platin-induced hepatic oxidant injury in rats / A. Koc // Mol. Cell. Biochem. – 2005. – **278**. – P. 79–84.
13. Leitao D. J. Quantification of sodium thiosulphate protection on Cisplatin 10 mg kg⁻¹ platin-induced toxicities / D. J. Leitao, B. W. Blakley // J. Otolaryngol. – 2003. – **32**. – P. 146–150.
14. Liposomal Forms of Rhenium Cluster Compounds: Enhancement of Biological Activity / N. I. Shtemenko, E. D. Zabitskaya, O. V. Berzenina [et al.] // Chemistry & Biodiversity. – 2008. – **5**. – P. 1660–1667.
15. Lu Y. Cisplatin 10 mg kg⁻¹ platin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1 / Y. Lu A. I. Cederbaum // Toxicol. Sci. – 2006. – **89**. – P. 515–523.
16. Mohamed Yousif Ibrahim. Attenuation of cisplatin-induced hepatotoxicity in rat using Zerumbone Mohamed Yousif Ibrahim // Research Journal of Biological Sciences. – 2009. – **4**, № 7. – P. 777–784.
17. Pratibha R. Enzymatic studies of Cisplatin 10 mg kg⁻¹ platin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats / R. Pratibha // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – **532**. – P. 290–293.
18. Rabik C. A. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents / C. A. Rabik, M. E. Dolan // Cancer Treatment Rev. – 2007. – **33**. – P. 9–23.
19. Reitman S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases / S. Reitman, S. Frankel // Amer. J. Clin. Pathol. – 1957. – **28**. – P. 56–63.
20. Shtemenko A. V. Synthesis, characterization, in vivo antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin / A. V. Shtemenko // Dalton Trans. – 2009. – **26**. – P. 5132–5136.
21. Shtemenko N. Dichlorotetra-mu-Isobutyrate dirhenium(III): enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. Shtemenko // Anticancer Res. – 2007. – **27**. – P. 2487–2492.
22. Taylor S. K. Erythropoietine (Erh-ipo) more than treatment of anemia in cancer and chemotherapy? / S. K. Taylor // Medical Hypothesis. – 2003. – № 1. – P. 89–93.
23. Visarus T. M. Pathways of glutathione metabolism and transport in isolated proximal tubular cells from rat kidney / T. M. Visarus // Biochem. Pharmacol. – 1996. – **52**. – P. 259–272.
24. Weijl N. I. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with Cisplatin 10 mg kg⁻¹ platin-based chemotherapy: A randomised, double-blind, placebo-controlled study / N. I. Weijl // Eur. J. Cancer. – 2004. – **40**. – P. 1713–1723.
25. Wildefield J. B. Gamma Glutamyl Transferase / J. B. Wildefield // Clinical Laboratory Sciences. – 2001. – **38**, № 4. – P. 263–355.
26. Zorzi D. Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases / D. Zorzi // Br. J. Surg. – 2007. – **94**, № 3. – P. 86–95.

Е. С. Кулинич, О. А. Демшина, Н. И. Штеменко
ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА

МОДУЛЯЦИЯ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ ЦИСПЛАТИНА КЛАСТЕРНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РЕНИЯ(III) В МОДЕЛИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Резюме

Введение соединения рения с изобутиратными лигандами, расположенными в цис-положении вокруг четвертичной связи, приводило к торможению процессов цитолиза клеток печени и снижению активации ферментативных процессов тканей печени в модели канцерогенеза и при введении цисплатина. Соединение $Re_{cisobut}$ проявило более эффективные свойства к модуляции гепатотоксического действия цисплатина, чем аналогичное соединение рения с адамантильными лигандами. Впервые изучено содержание глутатиона

в клетках печени и плазме крови крыс-опухоленосителей при введении системы рений–платина и предложено предположительную схему, объясняющую возможную роль глутатионовой системы в проявлении гепатопротекторных свойств соединений с четвертичной связью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **модуляция, гепатотоксичность, цисплатин, кластерные соединения рения(III).**

O. S. Kulinich, O. O. Dyomshyna, N. I. Shtemenko
OLES HONCHAR DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY

MODULATION OF CISPLATIN HEPATOTOXICITY USING CLUSTER COMPOUNDS OF RHENIUM(III) IN A MODEL OF CARCINOGENESIS

Summary

Introduction of compounds of Rhenium with isobutyrate ligands situated in cis-configuration around quadruple bond led to inhibition of cytolysis of liver cells and reduced activation of enzymatic processes of the liver tissue in a model of carcinogenesis. The compound with isobutyrate ligands showed more effective properties in modulation of cisplatin hepatotoxicity than the analogous rhenium compounds with adamantyl ligands. The Rhenium-Platinum were first studied glutathione content in the liver and blood plasma of tumor-bearing rats after introduction and possible role of glutathione system in hepatoprotective function compounds quadruple bond was proposed.

KEY WORDS: **modulation, hepatotoxicity, cisplatin, cluster compounds of Rhenium(III).**

Отримано 15.03.13

Адреса для листування: О. О. Дьомшина, вул. Тополина, 17, кв. 6, Дніпропетровськ, 49040, Україна, e-mail: d.olga.1970@gmail.com